

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/003094

International filing date: 18 February 2005 (18.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-055059
Filing date: 27 February 2004 (27.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 07 April 2005 (07.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

18.02.2005

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2004年 2月27日
Date of Application:

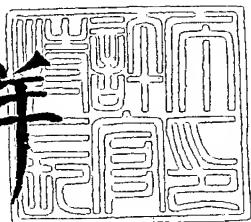
出願番号 特願2004-055059
Application Number:
[ST. 10/C]: [JP2004-055059]

出願人 株式会社 イツキ
Applicant(s):

2005年 3月25日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川洋



出証番号 出証特2005-3026760

【書類名】 特許願
【整理番号】 P03-1239
【提出日】 平成16年 2月27日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12N 1/00
【発明者】
【住所又は居所】 埼玉県朝霞市幸町3丁目12番5号 株式会社 イツキ内
【氏名】 油木 大樹
【発明者】
【住所又は居所】 埼玉県朝霞市幸町3丁目12番5号 株式会社 イツキ内
【氏名】 木曾 皓
【特許出願人】
【住所又は居所】 埼玉県朝霞市幸町3丁目12番5号
【氏名又は名称】 株式会社 イツキ
【代表者】 油木 大樹
【代理人】
【識別番号】 100091096
【弁理士】
【氏名又は名称】 平木 祐輔
【選任した代理人】
【識別番号】 100096183
【弁理士】
【氏名又は名称】 石井 貞次
【選任した代理人】
【識別番号】 100118773
【弁理士】
【氏名又は名称】 藤田 節
【選任した代理人】
【識別番号】 100101904
【弁理士】
【氏名又は名称】 島村 直己
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 015244
【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲**【請求項 1】**

植物病原性細菌の感染または増殖を抑制する能力を有するバチルス属に属する細菌を、植物病原性細菌の宿主となる植物に施用することを含む、植物病害の防除方法。

【請求項 2】

植物病原性細菌の感染または増殖を抑制する能力を有するバチルス属に属する細菌が、DAIJU-SIID2550 (受託番号FERM P-19591) またはその変異株である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

植物病原性細菌の宿主となる植物がアブラナ科、ナス科、ウリ科、ユリ科に属する植物である請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

植物病原性細菌が黒腐病菌であり、該植物病原性細菌の宿主となる植物がアブラナ科に属する植物であり、且つ、植物病害が黒腐病である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

植物への施用方法が、該細菌を該植物の種子に塗布する処理、該細菌を該植物の栽培土壤に灌注する処理、該細菌を該植物の栽培土壤に混和する処理、該細菌を該植物の茎葉に散布する処理、および、該細菌を該植物の付傷部に接触させる処理からなる群から選択される少なくとも 1 つの処理を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

植物病原性細菌の感染または増殖を抑制する能力を有するバチルス属に属する細菌を含む、植物病害の防除剤。

【請求項 7】

植物病原性細菌の感染または増殖を抑制する能力を有するバチルス属に属する細菌が、DAIJU-SIID2550 (受託番号FERM P-19591) またはその変異株である、請求項 6 に記載の防除剤。

【請求項 8】

植物病原性細菌が黒腐病菌であり、且つ植物病害が黒腐病である、請求項 6 または 7 に記載の防除剤。

【書類名】明細書

【発明の名称】バチルス属細菌を用いた植物病害の防除方法および防除剤

【技術分野】

【0001】

本発明は細菌性植物病害の防除方法およびそのための防除剤に関する。

【背景技術】

【0002】

野菜類などの換金作物の農業的栽培においては、種子伝染性、土壌伝染性、空気（水媒介）伝染性の植物病害の発生により、生産物の良質・安定・多収益を困難にすることが多い。特に病害が発生し易い異常気象条件に遭遇すると生産農家は致命的な打撃を受ける。

【0003】

これらの伝染性病害発生原因として認知されているものは、主に糸状菌（かび）、細菌（バクテリア）及びウイルスであり、正常な栽培が行われるためには、これらの病原による植物病害を防除することが不可欠である。

【0004】

農園芸植物を病害から防除する方法のうち効果的な方法として広く行なわれているものは、農薬（例えば殺真菌剤、殺細菌剤、抗ウイルス剤）を投与する化学的な方法である。近年、有機合成農薬はその効果ゆえに飛躍的な発達で普及し、病害の防除に威力を発揮し農作物の生産向上に大きく貢献してきた。しかし、農薬使用に偏った病害の防除は、農薬の土壌残留、食品残留、病原性微生物の薬剤抵抗性の増大など地球環境的、社会的、農業的に問題がある。また、農薬の過度の使用は農作業者の安全性の面からも問題がある。

【0005】

かかる問題点は国際的にも重大な関心が寄せられており種々の対策が採られつつある。その一例を挙げれば、土壌くん蒸剤である臭化メチル剤はオゾン層破壊の原因であるとして、2005年にはモントリオール議定書により、一部の使用を除き絶廃され全面的に使用が禁止されることとなっている。

【0006】

農薬への過度の依存を改めて自然生態系との調和のとれた総合的病害管理体系（Integrate Pest Management = IPM）を確立することは世界的に強く望まれている。

細菌等の生物の能力を利用して植物病害を防除する方法は上記の問題を解決するための有力な手段であると期待される。

【0007】

この出願の発明に関する先行技術文献情報としては次のものがある。

【特許文献1】特開昭63-273470号公報

【特許文献2】特開平2-22299号公報

【特許文献3】特開平8-175919号公報

【特許文献4】特開2003-277210号公報

【特許文献5】特開2002-145712号公報

【非特許文献1】Phae, C. G., Shoda, M., Kita, N., Nakano, M. およびUshiyama, K.: Ann. Phytopath. Soc. Japan, 58, 329-339, 1992

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、細菌による植物病害を生物的に防除する方法およびそのための組成物を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明は以下の発明を包含する。

(1) 植物病原性細菌の感染または増殖を抑制する能力を有するバチルス属に属する細菌

を、植物病原性細菌の宿主となる植物に施用することを含む、植物病害の防除方法。

(2) 植物病原性細菌の感染または増殖を抑制する能力を有するバチルス属に属する細菌が、DAIJU-SIID2550 (受託番号FERM P-19591) またはその変異株である、上記(1)に記載の方法。

(3) 植物病原性細菌の宿主となる植物がアブラナ科、ナス科、ウリ科、ユリ科に属する植物である上記(1)または(2)に記載の方法。

(4) 植物病原性細菌が黒腐病菌であり、該植物病原性細菌の宿主となる植物がアブラナ科に属する植物であり、且つ、植物病害が黒腐病である、上記(1)～(3)のいずれかに記載の方法。

(5) 植物への施用方法が、該細菌を該植物の種子に塗布する処理、該細菌を該植物の栽培土壌に灌注する処理、該細菌を該植物の栽培土壌に混和する処理、該細菌を該植物の茎葉に散布する処理、および、該細菌を該植物の付傷部に接触させる処理からなる群から選択される少なくとも1つの処理を含む、(1)～(4)のいずれかに記載の方法。

(6) 植物病原性細菌の感染または増殖を抑制する能力を有するバチルス属に属する細菌を含む、植物病害の防除剤。

(7) 植物病原性細菌の感染または増殖を抑制する能力を有するバチルス属に属する細菌が、DAIJU-SIID2550 (受託番号FERM P-19591) またはその変異株である、上記(6)に記載の防除剤。

(8) 植物病原性細菌が黒腐病菌であり、且つ植物病害が黒腐病である、上記(6)または(7)に記載の防除剤。

【発明の効果】

【0010】

本発明によれば、植物病原性細菌による植物病害を生物的に防除することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

本発明は、植物病原性細菌の感染または増殖を抑制する能力を有するバチルス属に属する細菌を、植物病原性細菌の宿主となる植物に施用することを含む、植物病害の防除方法に関する。

【0012】

本発明はまた、植物病原性細菌の感染または増殖を抑制する能力を有するバチルス属に属する細菌を含む、植物病害の防除剤に関する。

【0013】

本発明により、植物病原性細菌による植物病害を生物的に防除する方法およびそのための防除剤が提供される。バチルス属に属する細菌により植物病害を防除する方法はこれまでにも幾つか開示されているが(上記の特許文献1～5および非特許文献1参照)、何れも防除対象が糸状菌(すなわち真菌)性病害に限られ、細菌性病害を防除する方法は知られていない。

【0014】

本発明により防除される植物病害としては、細菌が病原である任意の植物病害が挙げられ、例えば、キサントモナス・カンペストリス・パソバー・カンペストリス (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*、本明細書において「黒腐病菌」という) のアブラナ科植物への感染により引き起こされる黒腐病(Black rot)、アグロバクテリウム・リゾゲネス (*Agrobacterium rhizogenes*) のメロンへの感染により引き起こされる毛根病(Hairy root)、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) のニンジンへの感染により引き起こされる根頭がんしゅ病(Crown gall)、バークホルデリア・グラジオリ (*Burkholderia gladioli*) のタマネギへの感染により引き起こされるりん片腐敗病、クラビバクター・ミチガネンシス・亜種・ミチガネンシス (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) のトマトへの感染により引き起こされるかいよう病(Bacterial canker)、コリネバクテリウム属細菌 (*Corynebacterium* sp.) のトウガラシ、ピーマンへの感染により引き起こされるかいよう病(Bacterial canker)、コリネバクテリウム属細

菌 (*Corynebacterium* sp.) のトマトへの感染により引き起こされる葉こぶ病 (Bacterial leaf gall)、クルトバクテリウム・フラクムファシエンス (*Curtobacterium flaccumfaciens*) のタマネギへの感染により引き起こされるかいよう病、エルウイナ・カロトボラ・亜種・カロトボラ (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*) のツケナ、サントウサイ、タイサイ、カブ、カリフラワー、キャベツ、キュウリ、ダイコン、パクチヨイ、タマネギ、トウガラシ、ピーマン、トマト、ナス、ニラ、ニンジン、ニンニク、ネギ、ハクサイ、プロッコリー、メロン、レタス (チシャ)への感染により引き起こされる軟腐病 (Bacterial soft rot, Slimy soft rot)、エルウイナ・クリサンテミ (*Erwinia chrysanthemi*) のイチゴへの感染により引き起こされる萎凋細菌病 (Bacterial stem rot)、エルウイナ・クリサンテミのカボチャへの感染により引き起こされる腐敗病 (Bacterial rot)、エルウイナ・クリサンテミのナスへの感染により引き起こされる茎腐細菌病 (Bacterial stem rot)、エルウイナ・クリサンテミのネギへの感染により引き起こされる軟腐病 (Bacterial soft rot)、エルウイナ・ラポンチシ (*Erwinia rhabontici*) のタマネギへの感染により引き起こされる腐敗病 (Soft rot)、エルウイナ属細菌 (*Erwinia* sp.) のニンニクへの感染により引き起こされる春腐病、シュードモナス・チコリ (*Pseudomonas cichorii*) のオクラへの感染により引き起こされる葉枯細菌病、シュードモナス・チコリのナスへの感染により引き起こされる褐斑細菌病 (Necrotic leaf spot)、シュードモナス・チコリのニンニクへの感染により引き起こされる春腐病、シュードモナス・チコリのメロン、レタス (チシャ)への感染により引き起こされる腐敗病 (Bacterial rot)、シュードモナス・コルガタ (*Pseudomonas corrugata*) のトマト、ナスへの感染により引き起こされる茎えそ細菌病 (Pith necrosis)、シュードモナス・フルオレセンス (*Pseudomonas fluorescens*) のトマトへの感染により引き起こされる茎えそ細菌病 (Pith necrosis)、シュードモナス・マージナリス (*Pseudomonas marginalis*) のナバナへの感染により引き起こされる花腐細菌病 (Bacterial bud rot)、シュードモナス・マージナリス・パソバー・マージナリス (*Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis*) のイチゴへの感染により引き起こされる芽枯細菌病、シュードモナス・マージナリス・パソバー・マージナリスのキャベツ、シュンギク、タマネギ、ネギ、ハクサイ、プロッコリー、レタス (チシャ)への感染により引き起こされる腐敗病 (Soft rot, Head rot)、シュードモナス・マージナリス・パソバー・マージナリスのキュウリへの感染により引き起こされる縁枯細菌病 (Marginal blight)、シュードモナス・マージナリス・パソバー・マージナリスのダイコンへの感染により引き起こされる黒点輪腐病、シュードモナス・マージナリス・パソバー・マージナリスのトマトへの感染により引き起こされる腐敗細菌病 (Bacterial rot)、シュードモナス・マージナリス・パソバー・マージナリスのニンニクへの感染により引き起こされる春腐病、シュードモナス属細菌 (*Pseudomonas* sp.) のイチゴへの感染により引き起こされる褐色腐敗病、シュードモナス属細菌のトマトへの感染により引き起こされる幼果黒変症状、シュードモナス属細菌のナスへの感染により引き起こされる斑点細菌病 (Bacterial spot)、シュードモナス属細菌のニラへの感染により引き起こされる株腐細菌病 (Bacterial basal bulb rot)、シュードモナス・シリング (*Pseudomonas syringae*) のタマネギ、ネギへの感染により引き起こされる斑点細菌病 (Bacterial leaf spot)、シュードモナス・シリング・パソバー・ラクリマンス (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*) のカボチャ、キュウリ、ニガウリ (ツルレイシ)、メロンへの感染により引き起こされる斑点細菌病 (Angular leaf spot, Bacterial spot)、シュードモナス・シリング・パソバー・マクリコラ (*Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*) のツケナ、サントウサイ、タイサイ、カブ、カラシナ・タカナ、カラフラワー、キャベツ、キョウナ (ミズナ)、ダイコン、ハクサイへの感染により引き起こされる黒斑細菌病 (Bacterial leaf spot, Bacterial black spot)、シュードモナス・シリング・パソバー・スピナチエ (*Pseudomonas syringae* pv. *spinaciae*) のホウレンソウへの感染により引き起こされる斑点細菌病 (Bacterial leaf spot)、シュードモナス・シリング・パソバー・トマト (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) のトマトへの感染により引き起こされる斑葉細菌病 (Bacterial speck)、シュードモナス・ビリジフラバ (*Pseudomonas viridiflava*) のオクラへの感染により引き起こされる葉枯細菌病、シュードモ

ナス・ビリジフラバのキャベツへの感染により引き起こされる腐敗病(Soft rot)、シードモナス・ビリジフラバのキュウリへの感染により引き起こされる縁枯細菌病(Marginal blight)、シードモナス・ビリジフラバのトマトへの感染により引き起こされる黒斑細菌病(Bacterial black spot)、シードモナス・ビリジフラバのナバナへの感染により引き起こされる花腐細菌病(Bacterial bud rot)、シードモナス・ビリジフラバのハクサイへの感染により引き起こされる褐条細菌病(Bacterial brown streak)、シードモナス・ビリジフラバのレタス(チシャ)への感染により引き起こされる腐敗病(Bacterial rot)、ラルストニア・ソラナセラム(*Ralstonia solanacearum*)のイチゴ、カブ、カボチャ、キュウリ、シュンギク、ダイコン、トウガラシ、ピーマン、トマト、ナス、ニガウリ(ツルレイシ)への感染により引き起こされる青枯病(Bacterial wilt)、リゾバクター・ダウチ(*Rhizobacter dauci*)のニンジンへの感染により引き起こされるこぶ病(Bacterial gall)、キサントモナス・カンペストリス(*Xanthomonas campestris*)のイチゴへの感染により引き起こされる角斑細菌病、キサントモナス・カンペストリスのシュンギクへの感染により引き起こされる黒腐病、キサントモナス・カンペストリスのブロッコリーへの感染により引き起こされる黒腐病(Black rot)、キサントモナス・カンペストリス・パソバー・アリイ(*Xanthomonas campestris* pv. *allii*)のネギへの感染により引き起こされる葉枯細菌病(Bacterial blight)、キサントモナス・カンペストリス・パソバー・カロテ(*Xanthomonas campestris* pv. *carotae*)のニンジンへの感染により引き起こされる斑点細菌病(Bacterial blight)、キサントモナス・カンペストリス・パソバー・ククルビタエ(*Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae*)のカボチャ、キュウリ、メロンへの感染により引き起こされる褐斑細菌病(Bacterial spot, Bacterial brown spot, Bacterial leaf spot)、キサントモナス・カンペストリス・パソバー・ラファニ(*Xanthomonas campestris* pv. *raphani*)のカブ、キャベツ、ダイコン、チンゲンサイ、ハクサイへの感染により引き起こされる斑点細菌病(Bacterial spot)、キサントモナス・カンペストリス・パソバー・ベシカトリア(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)のトウガラシ、ピーマン、トマトへの感染により引き起こされる斑点細菌病(Bacterial spot)、キサントモナス・カンペストリス・パソバー・ビチナス(*Xanthomonas campestris* pv. *viticans*)のレタス(チシャ)への感染により引き起こされる斑点細菌病(Bacterial spot)、キサントモナス・フランギエ(*Xanthomonas fragariae*)のイチゴへの感染により引き起こされる角斑細菌病、シードモナス・シリング・パソバー・オリゼ(*Pseudomonas syringae* pv. *oryzae*)のイネへの感染により引き起こされるかさ枯病(Halo blight)、イネ褐条病菌(*Acidovorax avenae* subsp. *avenae*)のイネへの感染により引き起こされる褐条病(Bacterial brown stripe)、エルウィナ・クリサンテミ・パソバー・ゼア(*Erwinia chrysanthemi* p. *zeae*)のイネへの感染により引き起こされる株腐病(Bacterial foot rot)、キサントモナス・オリゼ・パソバー・オリゼ(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)のイネへの感染により引き起こされる白葉枯病(Bacterial leaf blight)、エルウィナ・アナナス(*Erwinia ananas*)のイネへの感染により引き起こされる内穎褐変病(Bacterial palea browning)、バーグホルデリア・プランタリ(*Burkholderia plantarii*)のイネへの感染により引き起こされる苗立枯細菌病(Bacterial seedling blight)、バーグホルデリア・グルメ(*Burkholderia glumae*)のイネへの感染により引き起こされるもみ枯細菌病(Bacterial grain rot)、シードモナス・フスコバジネ(*Pseudomonas fuscovaginae*)のイネへの感染により引き起こされる葉しよう褐変病(Sheath brown rot)、シードモナス・シリング・パソバー・ジャポニカ(*Pseudomonas syringae* pv. *japonica*)のコムギへの感染により引き起こされる黒節病(Bacterial black node)、ラルストニア・ソラナセラム(*Ralstonia solanacearum*)のジャガイモへの感染により引き起こされる青枯病(Bacterial wilt)、エルウィナ・クリサンテミ・パソバー・クリサンテミ(*Erwinia chrysanthemi* pv. *chrysanthemi*)のジャガイモへの感染により引き起こされる萎凋細菌病(Bacterial stem rot)、エルウィナ・カロトボラ・亜種・アストロセプチカ(*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*)、エルウィナ・カロトボラ・亜種・カロトボラ、エルウィナ・クリサンテミ(*Erwinia chrysanthemi*)のジャガイモへの感染により引き起こされる黒

あし病 (Black leg) 、エルウイナ・カロトボラ・亜種・カロトボラのジャガイモへの感染により引き起こされる軟腐病 (Bacterial soft rot) 、クロストリジウム属細菌 (Clos tridium sp.) のジャガイモへの感染により引き起こされる粘性腐敗病 (Slimy rot) 、クラビバクター・ミチガネンシス・亜種・セペドニクス (Clavibacter michiganensis subsp. *sepedonicus*) のジャガイモへの感染により引き起こされる輪腐病 (Ring rot) 、キサントモナス・カンペストリス・パソバー・グリシヌス (Xanthomonas campestris pv. glycines) のダイズへの感染により引き起こされる葉焼病 (Bacterial pustule) 、シュードモナス・シリング・パソバー・グリシネ (Pseudomonas syringae pv. glycinea) のダイズへの感染により引き起こされる斑点細菌病 (Bacterial blight) 、イネ褐条病菌のトウモロコシへの感染により引き起こされる褐条病 (Bacterial brown stripe) 、バーグホルデリア・アンドロポゴニス (Burkholderia andropogonis) のトウモロコシへの感染により引き起こされる条斑細菌病 (Bacterial stripe) 、エルウイナ・クリサンテミ・パソバー・ゼア、シュードモナス・マージナリスのトウモロコシへの感染により引き起こされる倒伏細菌病 (Bacterial stalk rot) が挙げられるがこれらには限られない。黒腐病菌による黒腐病はアブラナ科植物の生産に致命的障害を与える病気として知られており、日本だけでなく世界的な重要病害として、既発生国及び未発生国共にその防除には多大の関心が寄せられている。従来、黒腐病に対しては実用的に認知された抵抗性品種はなく、有効な農薬も開発されていない。本発明によればアブラナ科植物、例えばキャベツ、ハクサイ、ダイコン、ブロッコリー、カリフラワー、カブ、チングンサイ、コマツナ、タイサイ、洋種ナタネ、シラクキナ、サントウサイ、アブラナ、コモチカンラン、カブラタマナ(コールラビ)、カイラン、ターサイ、カラシナ、ハボタン、ツケナにおいて黒腐病が効果的に防除され得る。

【0015】

本発明に使用され得るバチルス属に属する細菌としては、植物病原性細菌の感染または増殖を抑制する能力を有するものであれば特に限定されないが、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託されたDAIJU-SIID2550（受託番号FERM P-19591）が好ましい。この株はバチルス・アミロリクエファシエンス近縁種であることから、以下「BAL菌」と略記される。BAL菌を含有する植物病害防除剤は、植物および土壤への定着性が高く、病害防除活性の持続性が高く、40～100℃の高温に曝されても病害防除活性が維持されるため好ましい。本発明にはまた、BAL菌が変異誘発処理された変異株が用いられ得る。変異誘発処理は任意の適当な変異原を用いて行われ得る。ここで、「変異原」なる語は、その広義において、例えば変異原効果を有する薬剤のみならずUV照射のごとき変異原効果を有する処理をも含むものと理解すべきである。適当な変異原の例としてエチルメタンスルホネート、UV照射、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン、ブロモウラシルのようなヌクレオチド塩基類似体及びアクリジン類が挙げられるが、他の任意の効果的な変異原もまた使用され得る。

[0 0 1 6]

上記BAL菌は例えば次の方法により分離される。食用マッシュルーム培養残渣を80℃にて30分間蒸気滅菌し、この残渣：生理食塩水=1:9（重量比）に希釀し、この希釀液を振幅10cmの往復振とう機を用いて15分間振とうした後、500rpmで5分間低速遠沈して上清を得るか、または、東洋ろ紙No.2でろ過したろ液を採取する。続いて上清またはろ液を0.05%寒天を含む蒸留水で段階希釀する（細菌学実習提案 伝染病研究所学友会編）。段階希釀は、 $1 \times 10^1 \sim 8$ 倍液まで調整し、各希釀液を、径9cmシャーレ中のYPA培地（ペプトン・イースト・食塩培地。植物病原性微生物研究法－遺伝子操作を含む基礎と応用－脇本哲監修を参照されたい）に $100\mu\text{L}$ ずつ分注し、25℃の定温器で48～72時間静置培養し、生育した細菌を個別に採取することにより行われる。採種細菌はYPA斜面培地で継代培養される。継代培養された各細菌を、他菌が混合していないかを確認するために再び段階希釀を行い单一コロニーを得る。こうして純粋分離された单一コロニー細菌から、各单一コロニー細菌とカブ萎黄病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*、黒腐病菌に対する抗菌性を確認するための簡易マーカー)とのYPA培地上での対峙培養法で形成さ

れる阻止帯の強弱度に基づき、最も阻止力の強い細菌が選別される。

【0017】

こうして選別された細菌は以下の特性を有する。グラム染色性：陽性、内生胞子：有、形態：桿菌、G+C (DNA)割合 (mol%) : 43.5~44.9 (この値はバチルス・ズブチリス (B. subtilis) より高い。バチルス・ズブチリスは42~43である)、最適発育温度：25~30℃、バイオセーフティーレベル：レベル1 (ヒトに疾病を起こし、動植物に重要な疾患を起こす可能性のないもの)。

【0018】

本細菌の帰属分類群は、Microseqによる検体株の16S rDNA塩基配列解析、検体と近縁とされる菌株とその相同性、検体と近縁上位株との相違点および検体と近縁株との近隣結合法による系統樹から、バチルス・アミロリケファシエンス (Bacillus amylolyquefaciens) に極めて近い分類学上の位置にあることが明らかとなった。

【0019】

本細菌は、DAIJU-SIID2550として独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに2003年11月20日付けで寄託されている (受託番号FERM P-19591)。

【0020】

本発明に使用されるバチルス属細菌は、往復振とう培養、ジャーファメンター培養、培養タンク培養等の液体培養、固体培養等の通常の培養法により培養されうる。本発明に使用されるバチルス属細菌の培養のための培地は、細菌が効率的に対数増殖期に到達し得るものであれば特に限定されないが、25~30℃、48~96時間以内で生育量が最高に達するものが好ましく、25℃、48時間で生育量が最高に達するものがより好ましい。かかる培地としては例えば、炭素源としてグルコース、シュークロース、デンプン、デキストリン、黒砂糖、フスマ、米糠などの糖類を、窒素源として硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム等のアンモニウム塩、硝酸塩等の無機窒素源、または、酵母エキス、コーン・スティーブ・リーカー、肉エキス、小麦胚芽、ポリペプトン、サトウキビ絞り粕 (バカス)、ビールカス、大豆粉、米糠、魚粉等の有機窒素源を、無機塩としてリン酸一カリ、硫酸マグネシウム、硫酸マンガン、硫酸第一鉄等の、リン、カリウム、マンガン、マグネシウム、鉄等を含む塩類を、それぞれ含有する合成または天然の培地が挙げられる。また、振とう培養が行われる場合には必要に応じて消泡剤等の添加剤が加用されてもよい。バチルス属細菌が好気性菌であることから、好気的条件下での培養が好ましく、固体培養または通気攪拌培養、振とう培養等の液体培養が好ましい。また培養温度は、好ましくは10~50℃、より好ましくは15~40℃であり、培養pHは好ましくは5~9、より好ましくは6~8の範囲である。なお実施例5に示すように、上記要件を満たす培養が可能な培地としてオカラ・フスマ・米糠の混合物が好適に使用され得る。これらのものは産業廃棄物であるので、オカラ・フスマ・米糠を培地とする培養は産業廃棄物の有効利用という点で好ましい。

【0021】

本発明による植物病害の防除には、上記バチルス属細菌の培養液がそのまま使用され得るが、好ましくはより防除効果を高めることを目的として培養液を膜分離、遠心分離、濾過分離等の方法により分離した高濃度物が使用され得る。

【0022】

また、本発明には、上記バチルス属細菌の培養液を乾燥させたものが使用され得る。また、上記バチルス属細菌の培養液を遠心分離して得られた上清液を乾燥させたものが使用される。また、上記バチルス属細菌の培養液を遠心分離して得られる沈殿菌体を水で洗浄し乾燥させたもの (通常は菌体を約50~100重量%含む) が使用され得る。また、上記バチルス属細菌の培養液を活性炭粉末、珪藻土、タルク等の多孔吸着体に吸着させ乾燥させたもの (通常は菌体を $1 \times 10^8 \sim 10^9$ cfu/g含む) が使用され得る。いずれにしても乾燥方法は通常の方法でよく、例えば凍結乾燥、減圧乾燥でよい。これらの乾燥物は乾燥後さらにボールミル等の粉碎手段で粉碎されてもよい。ここで上記乾燥物の調製方法のBAL菌を用いた一例を具体的に示す。AG培地 (グルコース (和光純薬工業株式会社) 1% のBAL菌を用いた一例を具体的に示す。AG培地 (グルコース (和光純薬工業株式会社) 1%

、ポリペプトン（日本製薬株式会社）1%、KH₂PO₄（和光純薬工業株式会社）0.1%、MgSO₄・7H₂O（和光純薬工業株式会社）0.05%、pH 7.00、高圧滅菌15分間）100mLを入れた300mL容量の三角フラスコに、BAL菌の斜面培養物を1白金耳植菌した後、25℃で24時間、振とう培養（120回／分）する。続いて、得られた培養物100μLを上記AG培地100mLに植菌して好気的条件下で25℃にて48時間培養する。この培養液を遠心分離して培養上清と培養沈殿物に分離し、培養上清は採取し、沈殿物は水で洗浄し菌体を得る。または、この培養物を、径1.8cm、高さ10～15cmのガラス管またはプラスチック透明管に詰めた活性炭粉末（和光純薬工業株式会社）、珪藻土（和光純薬工業株式会社）、タルク（和光純薬工業株式会社）等の多孔吸着体に滴下吸着させて菌体を回収する。このようにして得られた培養上清液、水洗浄菌体または吸着菌体を、凍結乾燥または減圧乾燥により乾燥させ、ボールミルで粉碎することで、バチルス属細菌を含む乾燥物が得られる。

【0023】

バチルス属細菌は上述の培養液、高濃度物または乾燥物としてそれ自体単独で本発明に使用され得るが、更なる他の任意成分と組み合わせて通常の微生物製剤と同様の形態（例えば粉剤、水和剤、乳剤、液剤、フロアブル剤、塗布剤等の形態）に製剤化されてもよい。組み合わせて使用される任意成分としては例えば固体担体、補助剤が挙げられる。固体担体としては例えばペントナイト、珪藻土、タルク類、パーライト、バーミキュライト、カルボキシメチルセルロースナトリウム（CMC）、ビール粕、サトウキビ絞り粕（バカス）、オカラ、フスマ、キチン、米糠、小麦粉等の有機物粉末が挙げられ、補助剤としては例えばゼラチン、アラビアガム、糖類、ジェランガム等の固着剤や増粘剤が挙げられる。ビール粕、サトウキビ絞り粕（バカス）、オカラ、フスマおよび米糠はいずれも産業廃棄物であるから、これらが本発明に用いられれば産業廃棄物の有効利用という点でも好ましい。ここで、上記バチルス属細菌の培養液とオカラ等の産業廃棄物とが組み合わされた本発明の防除剤の一例を具体的に示す。まず、AG培地（グルコース（和光純薬工業株式会社）1%、ポリペプトン（日本製薬株式会社）1%、KH₂PO₄（和光純薬工業株式会社）0.1%、MgSO₄・7H₂O（和光純薬工業株式会社）0.05%、pH 7.00、高圧滅菌15分間）100mLを入れた300mL容量の三角フラスコにBAL菌の斜面培養物を1白金耳植菌した後、25℃下で往復振とう培養（120回／分）を行って、BAL菌の菌濃度を 1×10^7 cfu/mLに調整する。一方で、オカラ1300g、フスマ600g、米糠100gを混合する（以下、この混合物を基本増殖培地と称する）。前記培養液 1mLを基本増殖培地 100mLに植菌し、暗黒下で1日1回の割合で十分攪拌しながら72～120時間静置培養する。静置培養後に乾燥されて本発明の防除剤が得られる。こうして得られた防除剤中のBAL菌濃度は通常は1g当たり約 $4 \times 10^9 \sim 10^1$ cfuである。

【0024】

なお上記の通りBAL菌は食用マッシュルーム培養残渣から単離された菌株であるので、BAL菌を含む食用マッシュルーム培養残渣自体もまた本発明の植物病害防除剤として使用され得る。また食用マッシュルーム培養残渣は、必要に応じて乾燥され粉碎されていてもよい。食用マッシュルーム培養残渣またはその乾燥物中の菌体濃度が低い場合は、その残渣中にBAL菌の上記培養液、高濃度物、乾燥物等が適宜添加されてもよい。このとき、残渣中の最終的なBAL菌濃度が $1 \times 10^9 \sim 10^1$ cfu/mL以上となるように添加されるのが好ましい。食用マッシュルーム培養残渣は産業廃棄物の一種であるから、この残渣が植物病害防除剤として使用されることは産業廃棄物の有効利用という点からも好ましい。

【0025】

本発明における上記バチルス属細菌の植物への施用方法は、防除しようとする植物病害の種類、植物病害の発生状況、施用対象である植物の種類、バチルス属細菌の剤形などの諸条件に応じて適宜選択され、例えば、地上部散布、施設内施用、土壤混和施用、土壤灌注施用、表面処理（種子粉衣処理、種子塗布処理）等の各処理により行われ得る。このように本発明の防除剤は種子伝染防除法、土壤伝染防除法、空気（水媒）伝染（風・水による伝染）防除法（細菌性植物病害の防除法は一般的にこれら3分類に大別できる）のいずれの方法にも使用され得る。より具体的な施用方法としては、各種剤形の上記バチルス

属細菌を植物の種子に塗布する処理、植物の栽培土壤に灌注する処理、植物の栽培土壤に混和する処理、植物の茎葉に散布する処理、および、植物の付傷部に接触させる処理からなる群から選択される少なくとも1つの処理が行われることが好ましい。バチルス属細菌を植物の種子に塗布する処理は、例えばジェランガム、寒天、カルボキシメチルセルロースナトリウムなどの被膜形成剤を含む溶液にバチルス属細菌を懸濁させた液を植物種子に塗布した後に乾燥させるか、または、同様の懸濁液に植物の種子を浸漬させた後に乾燥させることにより行われ得る。

【0026】

更にまた、上記バチルス属細菌の植物への施用に際しては、必要に応じて通常使用される他の有効成分、例えば殺虫剤、殺線虫剤、殺ダニ剤、除草剤、殺真菌剤、殺細菌剤、抗ウイルス剤、肥料、土壤改良剤(泥炭等)、を混合施用するか、または、混合せずに交互施用もしくは同時施用することも可能である。本発明に使用されるバチルス属細菌の作用は、殆どの場合、実施例に示される通り、並行して施用される他の有効成分により妨げられない。

【0027】

本発明におけるバチルス属細菌の植物への施用量は、防除される植物病害の種類、植物病害の発生状況、施用対象である植物の種類、バチルス属細菌の剤形などの諸条件に応じて適宜決定される。例えば、BAL菌を含む液剤を黒腐病に罹患した植物の地上部に散布する場合は、液剤中のBAL菌の生細胞濃度は通常約 $1 \times 10^7 \sim 10$ cfu/mL、好ましくは約 $1 \times 10^8 \sim 9$ cfu/mLであり、その液剤の施用量は好ましくは100～250L/10aである。また、BAL菌を含む乾燥粉剤を黒腐病菌で汚染された栽培土壤に混和する場合は、乾燥粉剤中のBAL菌の生細胞濃度は通常 $1 \times 10^8 \sim 10$ cfu/g、好ましくは 1×10^9 cfu/gであり、その乾燥粉剤の施用量は好ましくは500～2000kg/10a、より好ましくは500～1000kg/10aである。なお、BAL菌含有防除剤を上記施用量により黒腐病菌で汚染された栽培土壤に十分攪拌して混和し、土壤水分約30～40%、地温20～30℃で土壤が乾燥しないように注意しながら5～7日間放置した後であれば、アブラナ科植物の種子を播種しても黒腐病に罹患することはない。

【0028】

以下に、BAL菌を用いた黒腐病防除に関する実施例を記載する。

【実施例1】

【0029】

BAL菌の最大増殖時間の検索

独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターにDAIJU-SIID2550として寄託されたバチルス・アミロリクエファシエンス近縁種(受託番号FERM P-19591)(以下BAL菌と呼称)1白金耳を滅菌水9mLに懸濁させ、この懸濁液100 μ Lを、300mL容量の三角フラスコに入れた100mLのAG培地(グルコース(和光純薬工業株式会社)1%、ポリペプトン(日本製薬株式会社)1%、KH₂PO₄(和光純薬工業株式会社)0.1%、MgSO₄・7H₂O(和光純薬工業株式会社)0.05%、pH 7.00、高圧滅菌15分間)、または、100mLの2%ショ糖加用ジャガイモ煎汁液体培地(ジャガイモ200gを賽の目に切り、約1Lの蒸留水を加えて30分～40分弱火で煮沸し、二重のガーゼでろ過する。ろ液に2%ショ糖を加えてたのち蒸留水で1Lとする。以下PS培地と呼称)に添加し、振幅10cm、120回/分の往復振とう機を用いて、25℃で144時間振とう培養した。培養開始後0時間、24時間、48時間、72時間、144時間の各時点において培養液1mLを採取した。採取された培養液試料を9mLの滅菌水に加え、良く攪拌して10倍希釈液を調製した。その後順次、試料を1mL採取して9mLの滅菌水に入れる操作を繰り返し、10⁷～⁸倍希釈液を調製した(10倍段階希釈法)。各希釈液を、径9cmシャーレ中のYPA培地(ペプトン・イースト・食塩培地)に100 μ Lずつ分注し、コーンラージ棒で均一に塗布し25℃で72時間培養した後、生じたコロニー数を調査することにより、各培養時間におけるBAL菌数(相対値)を求めた(表1)。最大増殖時間は48時間または72時間であった。このことからBAL菌と黒腐病菌とを共存させて培養した場合には、培養後48～72時間後に最大の防除効果が得られるものと期待される。

【0030】

【表1】

培養時間 ： (時間)	0	24	48	72	144
AG 培地	1	5,000	85,000	74,000	63,000
		—	74,000	124,000	115,000

※培養開始時の菌数 (cfu/mL) を 1 とした時の各培養時間における菌数を相対値で示した。

【実施例2】

【0031】

BAL菌による黒腐病菌の増殖抑制

BAL菌をYPA斜面培地から1白金耳かき取り、300mL容三角フラスコに入れたAG培地100mLに接種し、振幅10cm、120回/分の往復振とう機を用いて25℃で48時間振とう培養した。この培養液に黒腐病菌懸濁液を100μL接種し、同様の条件で更に48時間振とう培養した。ここで使用した黒腐病菌懸濁液は、2%ショ糖加用ジャガイモ煎汁寒天培地（以下PSA）斜面培地で培養した黒腐病菌を1白金耳かき取り滅菌水9mLに懸濁して調製したものである。対照実験（無処理区）として、BAL菌を接種していないAG培地100mLに黒腐病菌懸濁液を100μL接種して同様に25℃で48時間振とう培養した。各培養液をそれぞれ段階希釈法（実施例1参照）により希釈し、各希釈倍率（10万倍、100万倍、1000万倍）につき100μLずつ径9cmのYPA平板培地に塗布し、25℃で72時間培養し、生育した黒腐病菌のコロニー数を計測した。72時間培養後のコロニー（左：100万倍、右：1000万倍希釈）の様子を図1に示す。図1中、上段が黒腐病菌のみを培養したもの、下段が黒腐病菌とBAL菌とを共存させて培養したものである。黒腐病菌コロニー数計測結果を表2に示す。このように、黒腐病菌をBAL菌と共に25℃で48時間振とう培養したとき、黒腐病菌の増殖は完全に抑制された。

【0032】

【表2】

黒腐病菌コロニー数

希釈倍数	BAL菌混合 AG 培地使用	AG 培地使用
10万倍	0	744
100万倍	0	136
1000万倍	0	48

【実施例3】

【0033】

黒腐病菌人工汚染種子の作成

チングンサイ種子（品種 冬賞味）34gをガーゼで包み、150倍に希釈したケミクロンG（中性次亜塩素酸カルシウム 有効塩素70%）溶液500mLに10分間浸して種子を消毒した。消毒後、種子を流水で1時間洗浄し、水分を取り除いたあと、35℃で一夜乾燥させた。一方、黒腐病菌をあらかじめ5枚のPSA平板培地で3日間培養しておき、発育した菌を全てかきとて蒸留水100mLに懸濁し菌濃度 1×10^{12} cfu/mLの黒腐病菌液を調製した。上

記消毒種子17gを黒腐病菌液に20分間浸漬し、35℃で一夜乾燥させて人工汚染種子を作成した。人工汚染種子の汚染程度を確認したところ、汚染菌量は汚染種子1粒あたり 10^5 ~ 10^6 cfuであり、全処理種子汚染率は100%であった。また汚染種子を滅菌土に播種したところ、高率で子葉に病斑があらわれた（図2）。図2左側は、無処理種子（対照実験）を播種した結果、右側が黒腐病菌人工汚染種子を播種した結果である。

【実施例4】

【0034】

黒腐病菌人工汚染種子に対するBAL菌コート処理の効果

黒腐病菌人工汚染種子に対する処理は以下のように行った。1) 0.5%ジェランガム（S COTT LABORATORIES, INC.）水溶液50mL、または、2) 1.5%寒天（和光純薬工業株式会社）水溶液50mLに、あらかじめYPA平板培地2枚で培養したBAL菌を懸濁させ、マグネットミキサーで均一に攪拌した。この懸濁液50mL中に、実施例3で得られた黒腐病菌人工汚染種子300mgを浸漬し一夜静置したあと取り出して風乾した。対照実験（無処理区）としてBAL菌を混合していない0.5%ジェランガム水溶液50mLまたは1.5%寒天水溶液50mL中に黒腐病菌人工汚染種子を同様に浸漬し、風乾した。風乾後の種子をそれぞれYPA平板培地に置床し、25℃で72時間培養し、種子の周りに黒腐病菌が生育したか否かを調査した。調査結果をもとに、各処理区の被害を次式、

被害=黒腐病菌が周囲に生育した種子の数／置床した種子の総数
により算出した。この被害をもとに、次式により防除率を算出した。

$$\text{防除率} = 100 - (\text{処理区の被害} / \text{無処理区の被害}) \times 100$$

【0035】

結果を表3に示す。BAL菌を黒腐病菌人工汚染種子にコートさせた場合、種子に付着した黒腐病菌の増殖を抑制することができた。すなわち、BAL菌により黒腐病菌に汚染された種子を消毒することが可能である。

【0036】

【表3】

	防除率
1) BAL菌懸濁ジェランガム水溶液によるコート処理	100
2) BAL菌懸濁寒天水溶液によるコート処理	100

【実施例5】

【0037】

BAL菌のオカラを培地とする培養

105℃で20分間滅菌したオカラ100mLに対して 1×10^7 cfu/mLのBAL菌培養液1mLを混和し、暗黒下、25℃で48時間培養しBAL菌オカラ培養物を得た。このBAL菌オカラ培養物500mgを滅菌水9mLに懸濁し、実施例1と同様の10倍段階希釈法により得られた各希釈液100 μ Lを直径9cmシャーレ中のYPA培地にコーンラージ棒で均一に塗布し、BAL菌オカラ培養物のBAL菌菌数を測定した。また、BAL菌オカラ培養物の一部をとり100℃で一夜乾燥させ、含水率を求めた。BAL菌オカラ培養物中のBAL菌菌数は 4.3×10^9 cfu/gであり、含水率は87.6%であった。

【0038】

この実験からBAL菌は産業廃棄物であるオカラを培地として増殖させることができる事が確認された。また、本実施例で得られた、BAL菌オカラ培養物を乾熱乾燥させたものは、適度な菌体濃度と含水率を有しているため、BAL菌を含有する本発明の防除剤の調製のための種菌として使用できる。

【実施例6】

【0039】

黒腐病菌人工汚染種子に対するBAL菌オカラ培養物粉末コート処理の効果

実施例5で得られたBAL菌オカラ培養物（水分含量87%）を35℃で一夜乾燥させ、ボーラミルで粉碎してBAL菌オカラ培養物粉末とした。1) 0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム（以下CMC、和光純薬工業株式会社）水溶液50mL、または、2) 0.5%ジェランガム水溶液50mLにそれぞれBAL菌オカラ培養物粉末を500mg加え、10分間マグネットターラーで攪拌した。黒腐病菌人工汚染種子300mgをガーゼで包み10分間各液に浸漬し、十分に種子表面に付着させ、35℃で一夜乾燥させた。こうしてBAL菌オカラ培養物粉末コート処理種子を調製した。対照実験（無処理区）として、BAL菌オカラ培養物粉末を添加していない0.5%CMC水溶液または0.5%ジェランガム水溶液に黒腐病菌人工汚染種子を浸漬し、乾燥させた。

【0040】

また3) 上記のBAL菌オカラ培養物粉末2mgを黒腐病菌人工汚染種子200mg、0.5%CMC水溶液16μLとともに混合した（粉衣処理）。

【0041】

上記処理種子をNSCAA培地（Randhawa, P. S. and Schaad, N. W. (1984). *Phytopathology* 74: 268-272.）に20粒ずつ置床して25℃で72時間培養し、種子の周りに黒腐病菌が生育するか否かを調査した。上記実験1)～3)のうち1)および2)について、培養後の様子を図3に示す。図3中、左端から、CMC水溶液による処理区「1) 無処理区」、BAL菌オカラ培養物粉末混合CMC水溶液による処理区「1) 処理区」、ジェランガム水溶液による処理区「2) 無処理区」、BAL菌オカラ培養物粉末混合ジェランガム水溶液による処理区「2) 処理区」。

【0042】

周囲に黒腐病菌が生育した種子の数を調査して「被害」を算出し、「防除価」を求めた。「被害」および「防除価」は実施例4で定義した通りである。

【0043】

結果を表4に示す。1)～3)いずれの実験においても黒腐病菌の防除が確認された。すなわち、BAL菌オカラ培養物粉末を黒腐病菌人工汚染種子にコートすることにより、種子に付着した黒腐病菌の増殖を抑制することができた。コート補助剤としてはジェランガムよりもCMCが適していることが判明した。この結果から、BAL菌オカラ培養物粉末をCMC水溶液と混合したものを黒腐病菌人工汚染種子にコートすることにより黒腐病菌の種子伝染が阻害できることが示された。

【0044】

【表4】

	防除価
1) BAL菌オカラ培養物粉末混合CMC水溶液による処理	84.2
2) BAL菌オカラ培養物粉末混合ジェランガム水溶液による処理	25.0
3) BAL菌オカラ培養物粉末による処理（粉衣処理）	60.0

【実施例7】

【0045】

(1) 食用マッシュルーム培養残渣の調製

食用マッシュルーム培養残渣を次の手順により調製した。

切断した生稻藁を食用マッシュルーム栽培一ヶ月前に準備した。C/N比70%前後になるように大豆粕、米糠を補充し、適当な幅と高さに積み上げた。5日おきに散水しながら、腐熟するまで4回切返して堆肥とした。

【0046】

こうして得られた堆肥を栽培室で15~18cmの厚さにし、菌床とした。この菌床の温度が24℃に下がったところで種菌（アガリスのホワイト種）を植えつけ、温度16℃、湿度96%、炭酸ガス3000ppmの条件下で食用マッシュルームを栽培した。種菌植付け1週間後、菌床表面に菌糸が伸びたところで、大豆粉碎物を菌床全面に敷き、ロータリーで攪拌した。2週間後、ブラックピートモスを1m²当たり88kgのせた。種菌を植付けてから60日後に食用マッシュルームを収穫し、収穫後の廃床を80℃で30分間消毒した。こうして、食用マッシュルーム培養残渣を得た（なお、種菌としてアガリスのブラウン種を用いてもよく、マッシュルームの収穫は種菌を植付けてから60~90日後の適当な時期に行えばよい）。

【0047】

(2) 黒腐病菌汚染土壌中の黒腐病菌に対する増殖抑制試験

滅菌土に黒腐病菌を接種して黒腐病菌汚染土（黒腐病菌 1×10^{12} cfu/mL）を調製した。この黒腐病菌汚染土を25℃で1日静置後、この黒腐病菌汚染土1L当たり50gの割合で(10a当たり2,000kgの割合に相当)、上記の食用マッシュルーム培養残渣を混和し、25℃で5日間静置後、土壌中の黒腐病菌数を調査した。対照実験（無処理区）として、黒腐病菌による土壌汚染後、食用マッシュルーム培養残渣を混和しない土壌についても同様に黒腐病菌数を調査した。

【0048】

土壌中の黒腐病菌数の測定は次の手順で行った。すなわち、300メッシュのふるいを用いてふるった土壌20gを生理食塩水(0.85% NaCl)80mL中に加えて懸濁液を得、この懸濁液を、振幅10cm、120回/分の往復振とう機を用いて30分間振とうさせ、続いて500rpmで5分間遠心分離した。遠心分離後の上清を0.05%寒天を含む蒸留水で10倍段階希釀した後、希釀液500μLをNSCAA培地(Randhawa, P. S. and Schaad, N. W. (1984). Phytopathology 74: 268-272.)に滴下し、コーンラージ棒で均一に塗布し、25℃で培養後、黒腐病菌に特有の形状を示すコロニー数を調査し、黒腐病菌数を求めた。

【0049】

乾土1g当たりの黒腐病菌数は、食用マッシュルーム培養残渣を混合した場合（処理区）では 1.09×10^7 cfu、食用マッシュルーム培養残渣を混和しない場合（無処理区）では 7.06×10^7 cfuであった。

【0050】

次式、

$$\text{防除価} = 100 - (\text{処理区の黒腐病菌数}) / (\text{無処理区の黒腐病菌数}) \times 100$$

により防除価を算出したところ、84.6%であった。結果を表5にまとめる。

【0051】

この試験結果から、上記の食用マッシュルーム培養残渣を土壌混和施用することで、黒腐病菌の増殖を有意に抑制できることがわかる。

【0052】

【表5】

	黒腐病菌数 (cfu/g 乾土)	防除価 (%)
処理区	1.09×10^7	84.6
無処理区	7.06×10^7	—

【実施例8】

【0053】

黒腐病菌人工汚染種子に対するBAL菌培養液浸漬処理の効果、および、播種培土に食用マ

ツシュルーム培養残渣混合処理した場合の黒腐病発生抑制効果

BAL菌をAG培地に接種し7日間振とう培養して菌濃度が 1×10^6 cfu/mLとなったBAL菌培養液に、黒腐病菌人工汚染種子200mgをガーゼで包み一定時間浸漬した。浸漬時間は10分間、20分間、40分間、60分間とした。浸漬後は種子の水気を切り、広げて35℃で一夜乾燥させた。また比較のために、BAL菌を接種していないAG培地に黒腐病菌人工汚染種子を同時間浸漬し、乾燥させた。

【0054】

上記処理を施した種子を播種する培土として、蒸気土壤消毒機SB-150(株式会社丸文製作所)を使用して100℃で30分間処理した殺菌土(以下「殺菌土」)、および、食用マッシュルーム培養残渣(実施例7(1)参照)を殺菌土に2000kg/10aの割合で混合したもの(以下「食用マッシュルーム培養残渣混合土壤」)、をそれぞれ用意した。これらの培土各150mLを密閉可能な容器に入れ、上記処理を行った黒腐病菌人工汚染種子を20粒播種し、25℃で管理した。

また無処理区として、黒腐病菌人工汚染種子を殺菌土に播種した試験区を用意した。

【0055】

播種後9日目の様子を図4および図5に示す。図4の上段は「BAL菌接種AG培地浸漬+食用マッシュルーム培養残渣混合土壤」の条件での栽培結果、下段は「BAL菌接種AG培地浸漬+殺菌土」の条件での栽培結果(上下段とも左端から浸漬時間10分間、20分間、40分間、60分間)である。図5左端は、「無接種AG培地浸漬+殺菌土」の条件での栽培結果、中央は「BAL菌接種AG培地浸漬+殺菌土」の条件での栽培結果、右端は「BAL菌接種AG培地浸漬+食用マッシュルーム培養残渣混合土壤」の条件での栽培結果である(3種AG培地浸漬+食用マッシュルーム培養残渣混合土壤)である(3者とも浸漬時間は60分間)。

【0056】

播種後9日目に子葉に現れる黒腐病の病徵を調査した。調査は発病指數を以下の6段階に分けて行った。上段は

発病指數0：病徵なし

発病指數1：病斑面積が子葉の半分以下

発病指數2：病斑面積が子葉1枚分

発病指數3：病斑面積が子葉1.5枚分

発病指數4：病斑面積が子葉2枚分

発病指數5：枯死株

調査結果から次式、

$$\text{発病度} = (1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4 + 5n_5) / (5 \times \text{調査個体総数})$$

により発病度を算出した。なお、式中の文字n₁、n₂、n₃、n₄、n₅はそれぞれ、発病指數1、2、3、4、5を示した個体数を表す。

【0057】

算出された発病度から次式、

$$\text{防除価} = 100 - \text{処理区の発病度} / \text{無処理区の発病度} \times 100$$

により防除価を算出した。各処理区の防除価を表6に示す。表6からわかるように、黒腐病菌人工汚染種子をBAL菌培養液に浸漬することにより、黒腐病の発生が抑えられた。またBAL菌培養液への浸漬時間が長いほど効果が高く現れた。また、食用マッシュルーム培養残渣混合土壤を使用した試験区については、BAL菌培養液への浸漬時間が短い試験区(例えは10分間)であっても、BAL菌接種AG培地に60分間浸漬した種子を殺菌土に播種した場合とほぼ同等の防除価が得られた。

【0058】

【表6】

各処理区の防除価

			使用した土壤	
			殺菌土	食用マッシュルーム培養残渣 混合土壤
使 用 し た 浸 漬 液	BAL 菌 接種 AG 培地	浸 漬 時 間	20.7	60.3
		20 分	38.2	71.6
		40 分	56.2	75.8
		60 分	74.6	78.8
	AG 培地	浸 漬 時 間	2.7	30.1
		20 分	-7.5※	32
		40 分	-13.2※	20.8
		60 分	-7.5※	41.8

※防除価が負の値の試験区は発病度の数値がコントロールより大きかったことを示す

【実施例9】

【0059】

BAL菌培養液の地上部散布による黒腐病防除

4葉期のチングンサイ(品種 冬賞味)9株の葉に、AG培地中で振とう培養したBAL菌培養液(菌濃度 3×10^8 cfu/mL)を霧吹きで300mL散布した。1時間ほど静置した後、黒腐病菌液を霧吹きで300mL噴霧接種した。この黒腐病菌液は、あらかじめ5枚のPSA平板培地で培養した黒腐病菌を全てかきとり、蒸留水150mLに懸濁して黒腐病菌濃度 10^8 cfu/mLの接種用黒腐病菌液としたものである。接種後の植物を湿室(湿度80%)に入れ、20℃で管理した。また比較のために、BAL菌培養液を噴霧接種したのち黒腐病菌を接種しない試験区、および、BAL菌培養液を噴霧していないチングンサイ9株に同濃度の黒腐病菌液を噴霧接種した試験区(無処理区)、を用意した。実験開始後26日目の地上部を図6に示す。図6において、左1列は「BAL菌接種+黒腐病菌無接種」、中1列は「BAL菌接種+黒腐病菌接種」(処理区)、右1列は「BAL菌無接種+黒腐病菌接種」(無処理区)の栽培結果である。発病調査は33日後に葉に現れた黒腐病の病徵の有無を評価することで行った。まず発病葉率(調査葉枚数に占める発病葉枚数の割合)を求め、続いて次式

$$\text{防除価} = 100 - (\text{処理区の発病葉率} / \text{無処理区の発病葉率}) \times 100$$

により防除価を算出した。結果を表7に示す。BAL菌を黒腐病菌接種前にあらかじめ噴霧処理しておくと黒腐病の発病が抑制された。この結果から、BAL菌培養液を黒腐病菌宿主の地上部に予防散布することで黒腐病の発病と伝染が抑制できることがわかる。

【0060】

【表7】

	BAL菌	黒腐病菌	防除価
無処理区	無接種	接種	—
処理区	接種	接種	58.6

【実施例10】

【0061】

BAL菌に対する慣行的な殺菌剤または殺虫剤の影響

慣行的な殺菌・殺虫剤であるアミスター20フロアブル(シンジェンタ、アゾキシストロビン水和剤)・ジマンダイセン水和剤(ディーエーエス菱商、マンゼブ剤)、ロブラー水和剤(八洲化学、イプロジョン水和剤)、リゾレックス水和剤(住友化学、トルクロホスメチル水和剤)、スターナ水和剤(住友化学、オキソリニック酸水和剤)、ダコニール1000フロアブル(エスディーエス、TPN水和剤)、Zボルドー(日本農薬、銅水和剤)、ベンレート水和剤(住友化学、ベノミル水和剤)、リドミルMZ水和剤(シンジェンタ、マンゼブ・メタラキシル水和剤)、ベストガード水溶剤(住化武田、ニテンピラム水溶剤)、DDVP乳剤(日本農薬、DDVP乳剤)、アファーム乳剤(シンジェンタ、エマメクチン安息香酸塩乳剤)、アドマイヤー水和剤(バイエルクロップサイエンス、イミダクロプリド水和剤)、ランネット45水和剤(三共アグロ、メソミル水和剤)、パダンSG水溶剤(住化武田、カルタップ水溶剤)、モスピラン水溶剤(日本曹達、アセタミプリド水溶剤)、エルサン乳剤(日産化学、PAP乳剤)、アクタラ顆粒水溶剤(シンジェンタ、チアメトキサム水溶剤)、コテツフロップ(日本農薬、クロルフェナピル水和剤)、トレボン乳剤(三井化学、エトフェンプロックス乳剤)をそれぞれ所定の濃度に希釈した薬液を調製し、この薬液にろ紙(東洋濾紙No.2)を浸漬し乾燥させた。続いてこのろ紙に、BAL菌を蒸留水に懸濁(2×10^8 cfu/mL)させた懸濁液を1平方センチメートル当たり $44 \mu\text{L}$ 噴霧し、再び乾燥させ、25℃、暗黒条件で一夜静置させた。このろ紙を5~10ミリメートル角に切りYPA培地上で25℃暗黒条件で培養した。

【0062】

培養3日後及び4日後に、YPA培地上に置床した10ミリメートル角の濾紙片の周囲に生育するBAL菌を観察した。

【0063】

その結果を表8に示す。また培養4日後のプレートを図7に示す。BAL菌の生育は一部の薬剤を除き殺菌・殺虫剤による影響を受けなかった。但し、ジマンダイセン水和剤及びリドミルMZ水和剤が存在するとBAL菌の生育は非常に遅く、培養3日後ではほとんどコロニーが認められず、すなわち、BAL菌の生育が認められなかつたが、4日後以降徐々に生育が認められた。またスターナ水和剤及びダコニール1000フロアブルが存在するとBAL菌の生育は全く認められなかつた。

【0064】

以上の結果はBAL菌を含む本発明の植物病害防除剤が、多くの慣行的な殺菌・殺虫剤と混合施用、または混合せずに交互施用もしくは同時施用できることを示唆している。

【0065】

【表8】

BAL菌に対する慣行的な殺菌・殺虫剤の影響

	農薬名	希釈倍数	菌の生育状況*
殺 菌 剤	アミスター20 フロアブル	2000	+
	ジマンダイセン水和剤	1000	±
	ロブラー水和剤	1000	+
	リゾレックス水和剤	1000	+
	スターナ水和剤	2000	-
	ダコニール 1000 フロアブル	1000	-
	Z ボルドー銅水和剤	500	+
	ベンレート水和剤	2000	+
	リドミルMZ 水和剤	1000	±
殺 虫 剤	ベストガード水溶剤	2000	+
	DDVP 乳剤	2000	+
	アフーム乳剤	2000	+
	アドマイヤー水和剤	2000	+
	ランネット 45 水和剤	2000	+
	パダン SG 水溶剤	1500	+
	モスピラン水溶剤	4000	+
	エルサン乳剤	2000	+
	アクタラ顆粒水溶剤	3000	+
	コテツフロアブル	2000	+
	トレボン乳剤	2000	+

*+:培養3日後にコロニーが認められた ±:生育が遅く培養4日後にコ

ロニーが認められた -:コロニーが認められない

【図面の簡単な説明】

【0066】

【図1】BAL菌による黒腐病菌の増殖抑制効果を示す図である。

【図2】チングンサイの黒腐病菌人工汚染種子を発芽させた場合の黒腐病菌発病状況を示す図である。

【図3】BAL菌含有防除剤処理済み黒腐病菌人工汚染種子の周囲の黒腐病菌の生育状況を示す図である。

【図4】実施例8における実験開始後9日目の様子を示す図である。

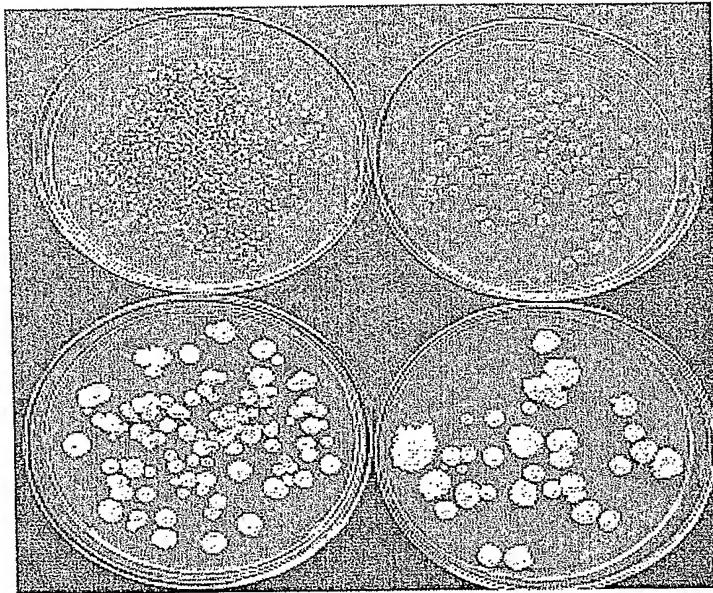
【図5】実施例8における実験開始後9日目の様子を示す図である。

【図6】実施例9における実験開始後26日目の様子を示す図である。

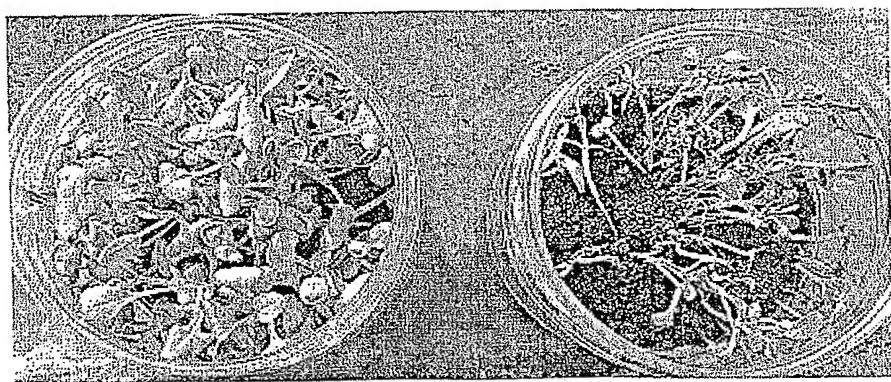
【図7A】BAL菌の増殖に対する殺菌剤、殺虫剤の影響を示す図である。

【図7B】BAL菌の増殖に対する殺菌剤、殺虫剤の影響を示す図である。（図7Aの続き）

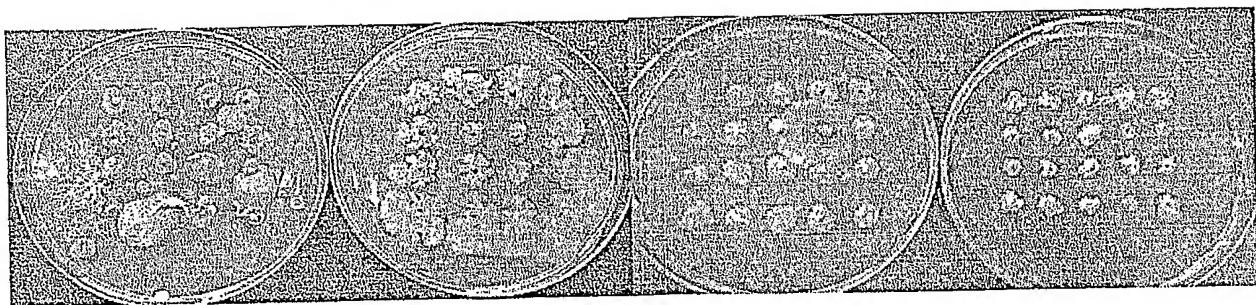
【書類名】 図面
【図 1】



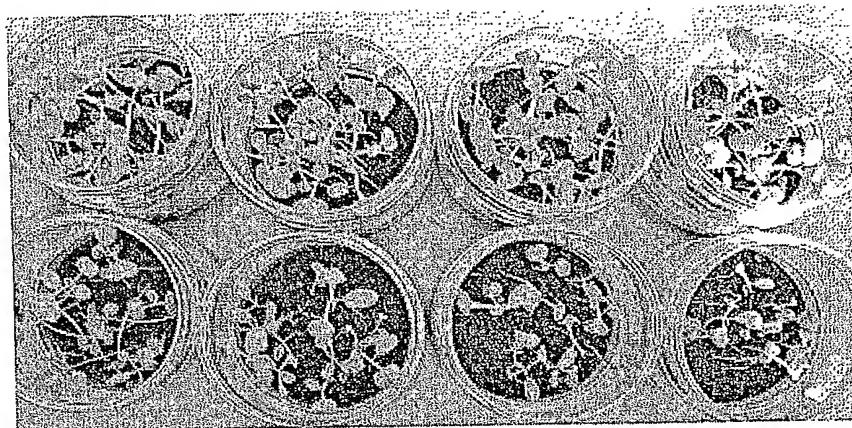
【図 2】



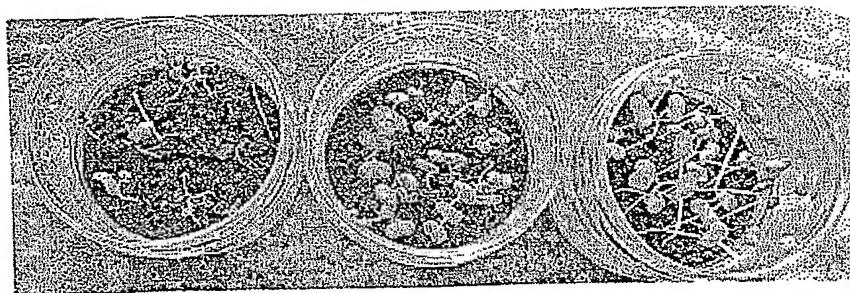
【図 3】



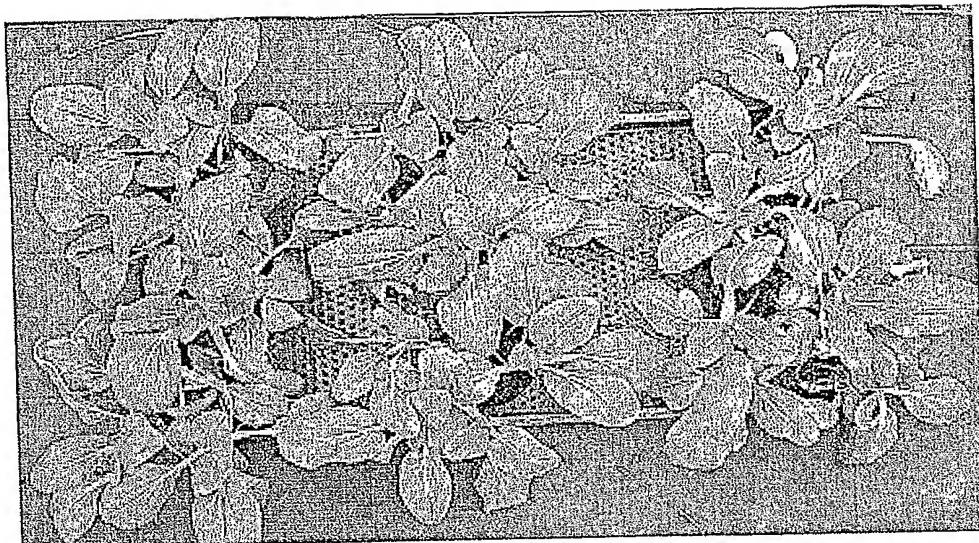
【図 4】



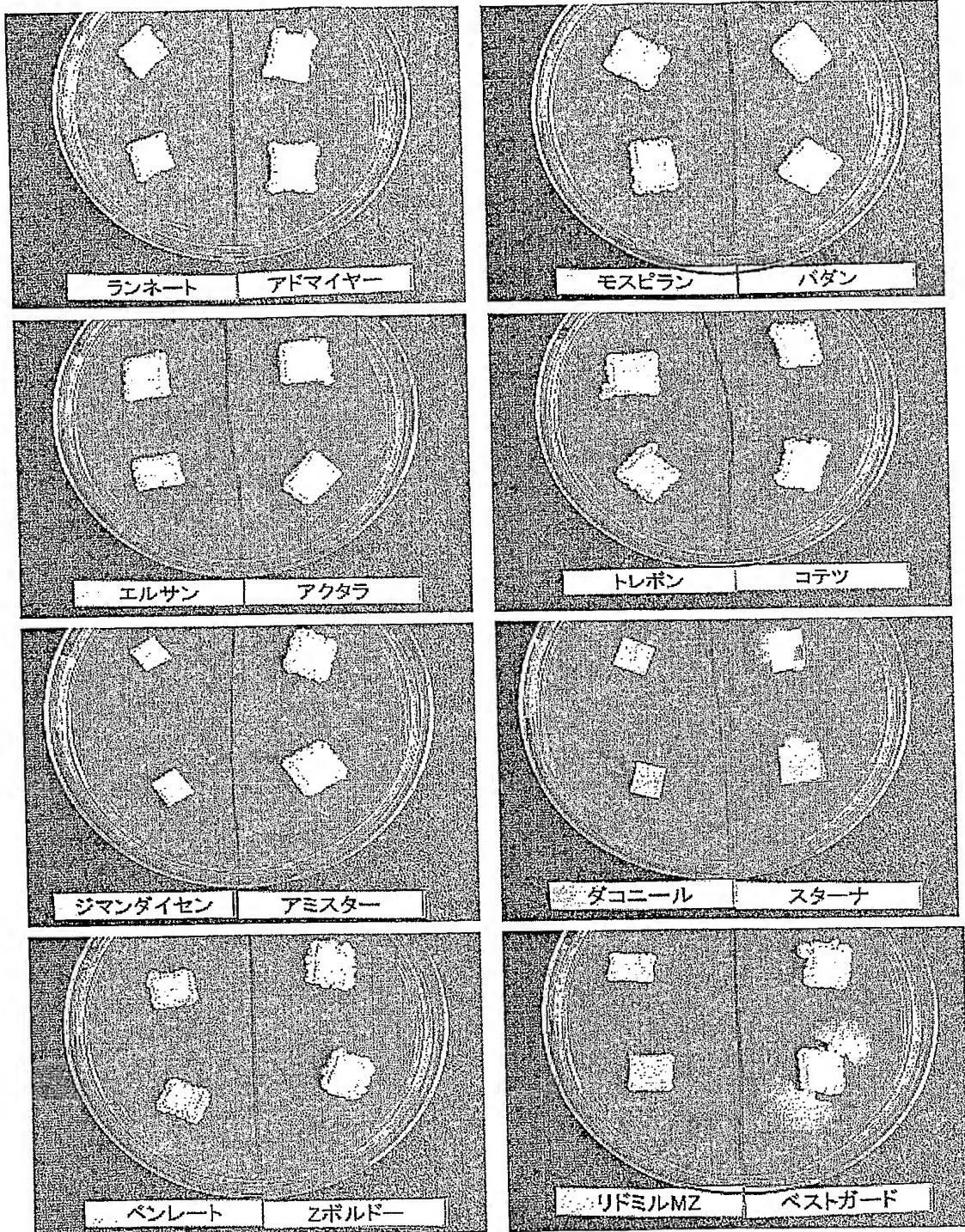
【図 5】



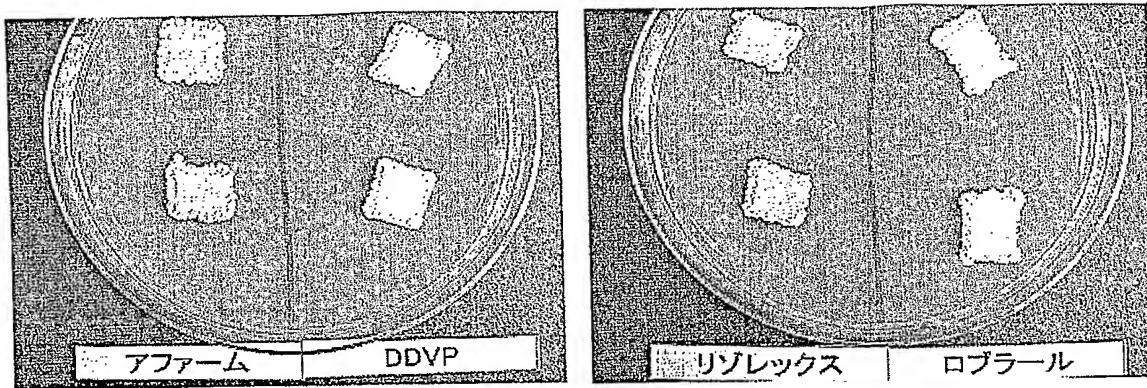
【図 6】



【図7A】



【図 7 B】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 本発明は、植物病原性細菌が原因である植物病害を生物的に防除する方法およびそのための組成物を提供することを目的とする。

【解決手段】 本発明は、植物病原性細菌の感染または増殖を抑制する能力を有するバチルス属に属する細菌を、植物病原性細菌の宿主となる植物に施用することを含む、植物病害の防除方法、およびそのための防除剤に関する。

【選択図】 なし

特願 2004-055059

出願人履歴情報

識別番号

[504078512]

1. 変更年月日

2004年 2月 27日

[変更理由]

新規登録

住 所

埼玉県朝霞市幸町3丁目12番5号

氏 名

株式会社 イツキ